pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 3, pp. 219~228 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.3.219

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

HPLC-DAD를 이용한 식품 중 Zeaxanthin과 Citranaxanthin의 동시 시험법 개발 및 검증

이수빈†* · 이다애† · 백채완 · 남혜선 · 오재명 · 최윤주
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 첨가물포장과

Development of a Method for Simultaneous Analysis of Zeaxanthin and Citranaxanthin in Foods using High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector

Soo Bin Lee†*, Da-Ae Lee†, Chae-Wan Baek, Hye Seon Nam, Jae Myeong Oh, Youn Ju Choi
Food Additives and Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received May 1, 2025/Revised May 28, 2025/Accepted May 30, 2025)

ABSTRACT - This study aimed to develop and validate an optimized method for simultaneous analysis of zeaxanthin and citranaxanthin, compounds not yet designated as food colorants in Korea, using high-performance liquid chromatography (HPLC). To establish the optimal analytical conditions, various international HPLC-based methods reported in the literature were reviewed and compared. Key validation parameters, such as linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, precision, and inter-laboratory verification were considered when selecting the HPLC conditions suitable for various food matrices. The developed method demonstrated excellent linearity (R^2≥0.999). The LOD and LOQ for zeaxanthin and citranaxanthin in food matrices were 0.11-0.32 mg/kg and 0.14-0.20 mg/kg, and 0.33-0.96 mg/kg and 0.42-0.60 mg/kg, respectively. Although conventional sample preparation methods in previous studies had limitations across various food groups, the newly developed method is applicable to all major food groups containing carotenoid pigments. The method achieved recovery rates exceeding 90% for zeaxanthin and citranaxanthin in the assessment of applicability. In addition, the accuracy (recovery) and precision (% relative standard deviation) of the method were within the acceptable ranges specified by the Ministry of Food and Drug Safety Guidelines (2016). These results suggest that the developed method of simultaneous HPLC is a reliable and valid tool for analyzing zeaxanthin and citranaxanthin in food matrices.

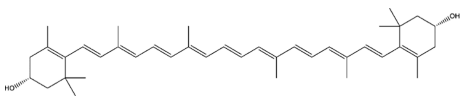
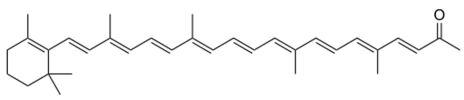
Key words: Zeaxanthin, Citranaxanthin, HPLC analysis, Method validation

카로티노이드는 식물, 조류, 효모, 박테리아 등 다양한 생물에서 발견되는 아이소프레노이드(isoprenoid) 기반의 지용성 색소로, 주로 빨간색, 주황색 또는 노란색을 띠는 색소이다. 현재까지 자연계에서는 약 700종 이상의 카로티노이드가 보고되었으며, 탄소의 개수 및 작용기의 종류에 따라 다양한 생리 활성을 나타낸다[1,2]. Zeaxanthin은 xanthophyll 계열에 속하는 카로티노이드로, 냄새가 거의 없는 주황에서 적색을 띠는 결정성 분말이다. 이는 항산화특성을 지니고 있어 황반변성, 백내장, 관상동맥심장병, 뇌졸중과 같은 만성 안과 및 심혈관 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[3]. Citranaxanthin은 측쇄에 메틸 케톤 그룹이 있는 카로티노이드로, 진한 보라색 결정체이며 산소와 빛에 민감한 특성을 가지고 있다. 이는 자유 라디칼 제거 능력이 있어 심혈관 질환 및 암과 같은 특정 질병의 예방에 중요한 역할을 하기도 한다[4]. Zeaxanthin 및 citranaxanthin은 n-octanol/water 분배계수(Log P_{ow})가 각

*Correspondence to: Soo Bin Lee, Food Additives and Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4361, Fax: +82-43-719-4350
E-mail: lsbin0830@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Physicochemical characteristics of zeaxanthin and citranaxanthin

Property	Zeaxanthin	Citranaxanthin
Structure		
IUPAC name	(3R,3′R)-β,β-Carotene-3,3′-diol	(3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E,19E)-5,9,14,18-tetramethyl-20-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)icosa-3,5,7,9,11,13,15,17,19-nonaen-2-one
CAS no.	144-68-3	3604-90-8
Molecular formula	$C_{40}H_{56}O_2$	$C_{33}H_{44}O$
Molecular weige (g/mol)	568.88	456.71
Appearance	Orange-red crystalling powder, with little or no odour	A deep violet crystal
Solubility	Insoluble in water; soluble in lipophilic solvents such as DMSO and DMF	Insoluble in water; very slightly soluble in ethanol; slightly soluble in vegetable oils; soluble in chloroform
Melting point (℃)	215.5	156.0
Boiling point (℃)	572.6	612.0 to 613.0

각 14.95와 10.41인 비극성 화합물로 분자구조 및 물리·화학적 특성은 Table 1에 제시하였다.

국제식품첨가물전문가위원회(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)[5]는 2004년 zeaxanthin의 인체노출안전기준(acceptable daily intake, ADI)을 0-2 mg/kg bw로 설정하였으나, 2018년 광범위한 연구에서 독성이 나타나지 않았다는 점을 근거로 하여 ADI를 “not specified”로 설정하였다. citranaxanthin에 대해서는 1987년에 안전성에 문제가 없다고 판단하여 ADI를 설정하지 않았다. 또한 두 물질 모두 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)[6]의 발암성 분류 목록에는 포함되어 있지 않다.

현재 국내에서는 두 물질 모두 식품첨가물로 지정되어 있지 않으며, 공인시험법 또한 마련되어 있지 않다. 국내뿐만 아니라 일본, 미국, EU와 같은 주요 외국에서도 식품첨가물로 지정되어 있지 않으며, 공인시험법은 아직 알려진 바가 없다. 반면 코덱스(Codex Alimentarius Commission, Codex)[7]는 두 물질을 착색료로써 식품첨가물로 규정하고 있으나, 사용기준 및 시험법은 별도로 지정하고 있지 않다.

최근 수입식품의 경우 허용되지 않은 착색료가 검출되거나 사용기준을 위반하는 사례가 빈번하여 검사를 지속적으로 수행하여야 하나, 국내 공인시험법은 주로 타르색소에 국한되어 있어 문제의 소지가 있는 착색료에 적용하는 데에 제한점이 있다. 또한 일부 착색료의 경우 국가 간 지정 현황이 상이하여, 국내에서 허용되지 않은 착색료가 첨가된 수입 식품이 유통될 경우 판매 중단, 회수 등의 행정조치가 필요하기 때문에 식품 중 미지정 착색료의 선제적인 안전관리를 위해 시험법 개발이 필요하다[8]. 그러나 현재 국내 미지정 착색료인 zeaxanthin 및 citranaxanthin에 대해 기기분석법을 활용한 지속적인 연구가 있으나 적용 가능한 대상식품이 제한되어 검사기관 등에서 광범위하게 적용하기 어려우며 식품 matrix에 대한 동시분석법이 부재한 상황이다.

따라서, 본 연구에서는 수입 식품 등의 사전 예방적 안전관리를 위해 zeaxanthin과 citranaxanthin의 전처리법과 기기분석법을 비교·검토하고 개선함으로써 동시분석법을 최적화하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

본 실험에 사용된 표준품 zeaxanthin (≥95.0%)과 citranaxanthin (≥98.6%)은 각각 Merck (Frankfurt, Germany), ALFA Chemistry (Holbrook, NY, USA)로부터 구입하였다. 1-Butanol (≥99.7%), tert-Butyl Methyl Ether (≥99.8), water는 모두 HPLC 등급(high performance liquid chromatography grade)으로 Merck에서 구입하여 사용하였다. 분석에 사용된 검체는 온라인 및 대형마트에서 시료를 구입한 후, 분쇄기(Blixer 5 plus, Robot Coupe, Vincennes, France)를 이용하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 밀봉된 용기에 담아 -20°C 냉동고에 보관하면서 zeaxanthin 및 citranaxanthin 분석에 사용하였다.

식품분석

카로티노이드계 착색료(예: β-carotene, lycopene 등)의 사용이 허용된 식품 중 zeaxanthin 및 citranaxanthin을 함유하지 않은 가공식품을 대상 식품으로 선정하였다. 최근 3년간의 품목제조보고 관리대장과 수입검사 접수 목록을 조사하

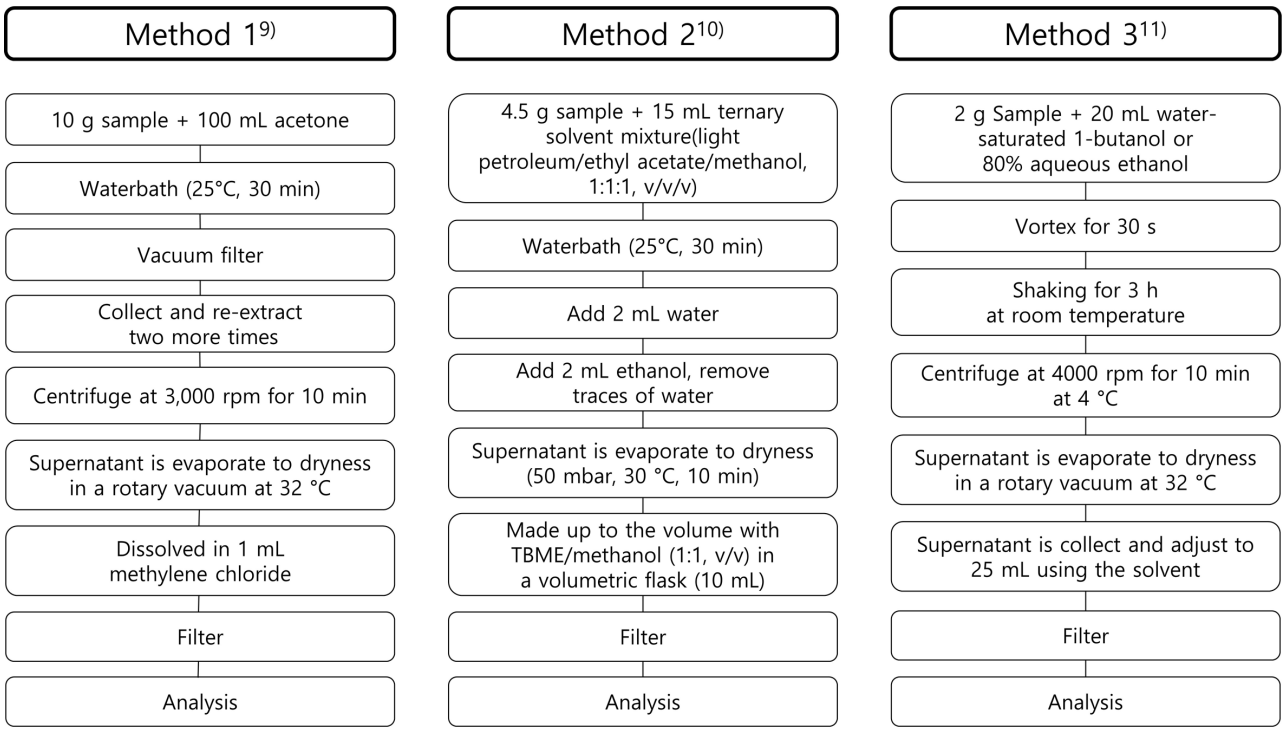


Fig. 1. Pretreatment methods for extraction of zeaxanthin and citranaxanthin in foods.

여 사용빈도수를 기준으로 대상 식품을 과자, 조미식품, 수산가공식품의 3개 품목으로 분류하였다. 이들 식품을 대상으로 본 연구에서 확립된 분석법의 적용을 검토하였다.

표준용액 조제

표준품 zeaxanthin 및 citranaxanthin을 각각 1 mg씩 정밀히 달아 10 mL의 수포화부탄올(water-saturated n-butanol)에 용해하여 100 mg/L의 표준원액(stock solution)을 조제하였다. 표준용액(standard solution)은 수포화부탄올을 이용하여 각각 1, 2, 5, 10, 20 mg/kg이 되도록 희석하여, matrix가 첨가된 matrix-matched 표준용액을 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

전처리 방법 및 기기조건

시험법 마련을 위해 세 가지 문헌상의 HPLC 분석법을 비교 분석하였으며, 대표 시료로는 과자, 조미식품, 수산가공식품으로 선정하여 문헌 시험법 비교를 진행하였다 (Fig. 1).

분석법 1은 Strati 등[9]이 개발한 C_{30} 역상 컬럼을 사용한 변형된 구배 용출 HPLC 방법을 통해 토마토, 달걀노른자, 새우 등에 포함된 carotenoids를 효율적으로 분리 및 분석한 방법이다. 분석법 2는 Schlatterer 등[10]이 조리 전후 달걀노른자 내 xanthophylls (lutein, zeaxanthin 등)의 함량 변화를 측정하기 위해, 혼합 용매(Light petroleum/ethyl acetate/methanol)를 사용하여 다양한 색소를 효과적으로 추출하고 동시 분석할 수 있도록 개발한 방법이다. 분석법 3은 Shen 등[11]이 기장(millet)에 함유된 carotenoids (all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin) 성분과 조리법이 색소 함량에 미치는 영향을 분석한 연구이며, 추출 용매로 수포화 부탄올과 80% 에탄올 등을 사용하여 승인된 AACC 방법(AACC International)[11]에 따라 색소 추출 효율을 비교·분석하였다. 각 문헌에서는 제한된 식품 유형에 대해 전처리법을 확립하여 보고하였으나, 본 연구에서는 다양한 식품유형에 적용 가능성을 확인하기 위하여 과자, 조미식품, 수산가공식품에 동일하게 적용하였다.

분석에는 diode array detector (DAD)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, Agilent 1260 infinity system, Agilent co., Santa clara, CA, USA)가 사용되었으며, YMC Carotenoid (4.6 mm i.d.×250 mm, S-5 μm, YMC CO., Kokufudai, Japan) 컬럼을 사용하였다. 각 분석법에 적용된 HPLC 분석 조건은 Table 2와 같다.

분석법 타당성 및 적용성 검증

본 연구에서는 분석법의 타당성을 검증하기 위해 CODEX 가이드라인(CAC/GL 40-1993)[13] 및 식품의약품안전평가원(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인'[14]에 근거하여 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확성

Table 2. The conditions of HPLC methods

	Method 1[9]	Method 2[10]	Method 3[11]
Column	YMC C30 Carotenoid (4.6 mm I.D.×250 mm, 5 μm)		
Column temp.	35°C		
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 1-butanol C: Methylene chloride	A: Methanol B: Methanol/tert-butyl methyl ether /water (6:90:4)	A: Methanol/ tert-butyl methyl ether/ water (81:15:4) B: Methanol/tert-butyl methyl ether (10:90)
Detection wavelength	λ.=450 nm	λ.=450 nm	λ.=453 nm
Flow rate	2 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Injection vol.	20 μL	20 μL	10 μL
Run time	50 min	40 min	30 min

(accuracy), 반복성(repeatability), 실험실간 검증(inter-laboratory) 등을 평가하였다. 표준용액을 최종 농도 1, 2, 5, 10, 20 mg/kg이 되도록 각 시료에 첨가한 후, 각 농도 범위(X축)에 대한 peak의 면적(Y축)으로 검량선(matrix-matched calibration)을 작성하고, 결정계수(R^2)를 통해 직선성을 확인하였다. 정확도 및 정밀도는 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 분석을 통해 산출되었으며, 시료에 표준용액을 첨가하여 최종 농도 1, 5, 10 mg/kg로 조제한 검액을 1일 3회씩, 3일간 반복 실험하여 얻은 회수율의 표준편차를 평균치로 나누어 상대표준편차(RSD%)로 나타내었다[15]. LOD 및 LOQ 측정은 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 측정하였다. 이때 기울기는 각 분석 대상 물질의 검량선으로부터 구하였으며, 반응의 표준편차는 회귀직선에서 y절편의 표준편차를 이용하여 구하였다.

$$LOD=3.3\times\sigma/S$$
$$LOQ=10\times\sigma/S$$

(σ: the standard deviation of intercept, S: the slope of the calibration curve)

실험실간 검증은 3개의 실험실에서 수행되었으며, 대상 시료는 과자, 조미식품, 수산가공식품으로 선정하였다. 이는 시험법을 확립한 실험실과 동일한 조건에서 수행되었으며, 각 실험실은 동일한 전처리 방법 및 기기 분석 조건을 적용하여 회수율 등 분석법의 타당성을 검증하였다. 유통 식품의 적용성 검토는 바탕시료에 zeaxanthin과 citranaxanthin을 1 mg/kg이 되도록 첨가하여 3반복 분석함으로써 진행하였으며, 결과값의 회수율을 산출하여 확인하였다.

통계분석

본 연구에서 얻은 모든 측정값은 Microsoft Office Excel 2021 (Microsoft, Red-mond, WA, USA)의 통계 분석 도구를 이용하여 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였으며, $P<0.05$ 수준에서 시료 간 통계적 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

HPLC 분석법 비교

Zeaxanthin 및 citranaxanthin은 JECFA에서는 식품첨가물로 지정하여 착색료로 사용 가능하나 현재 한국, 일본, EU, 미국에서는 식품첨가물로 지정하고 있지 않으므로, 사용 기준 및 공인 시험법이 별도로 규정되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 최근 국내외 문헌에 발표된 다양한 HPLC 분석법을 비교 및 검토하여 최적의 분석방법을 도출하고자 하였다.

최적 동시분석을 위해 세 가지 문헌 기반의 HPLC-DAD 분석법을 재현 및 비교 분석하였다. 각 분석법의 기기 분석 적합성을 평가하기 위해 직선성을 확인하였으며, 정확성은 zeaxanthin 및 citranaxanthin이 함유되지 않은 공시료(과자, 조미식품, 수산가공식품)에 최종 농도가 각각 10 mg/kg이 되도록 표준용액을 첨가한 후, 회수된 농도에 기반하여 회수율을 산출하여 검토하였다(Table 3).

분석법 1 적용 시, 검출된 표준용액의 피크가 명확하게 분리되지 않았으며(Fig. 2), 시험용액에서 다수의 불순물 피크가 검출되어 표준용액의 머무름 시간과 구분이 어려움을 확인하였다. 분석법 2의 경우 표준용액 피크의 분리도는 우수하였으나, 조미식품 분석 시 숄더 피크 및 매트릭스 간섭이 관찰되었다. 이는 복합조미료에 포함된 향신료 추출물의 영향으로 판단되었다[16].

분석법 3 적용 시, 추출용매로 수포화 부탄올과 80% 에탄올을 각각 사용하여 분석한 결과 두 용매 모두 피크의 분리도가 우수하게 나타났으며, 결정계수(R^2) 또한 0.99 이상으로 우수한 직선성을 확인할 수 있었다. 회수율 평가에서는 80% 에탄올을 사용한 경우, 회수율이 14.3-139.7%로 MFDS 가이드라인[14]에서 제시한 기준 범위인 70-125%

를 벗어나 적절하지 않다고 판단하였다. 반면, 수포화 부탄올을 사용한 경우에는 과자에서 111.9-115.2%, 조미식품에서 107.7-107.8%, 수산가공식품에서 111.3-114.7%로 모든 시료에서 회수율이 적정하여 추출용매로서 가장 적합하다고 판단하였다. 이러한 결과는 Shen 등[11]이 보고한 것과 일치하였으며, 특히 수포화 부탄올은 분리피크가 상대적으로 좁고 대칭적인 삼각형 형태를 보여 HPLC 분석에 보다 적합한 것으로 나타났다.

이에 따라 본 연구에서는 분석시간이 짧고 식품 중 회수율이 다른 분석법보다 우수한 분석법 3을 최적 동시분석법으로 선정하였고, 이를 바탕으로 세부 분석 조건 개선을 검토하였다.

Table 3. Comparison of recoveries of zeaxanthin and citranaxanthin in various pretreatment conditions

Method	Matrix	Recovery±SD (%)	
		Zeaxanthin	Citranaxanthin
Method 1	Cracker	206.4±2.6	195.5±8.3
	Seasoning powder	109.6±14.9	109.0±13.3
	Processed seafood	166.4±23.6	153.3±23.7
Method 2	Cracker	79.6±3.1	80.4±1.3
	Seasoning powder	79.2±2.2	85.3±2.9
	Processed seafood	84.0±2.2	88.2±4.6
Method 3 (80% ethanol)	Cracker	139.7±3.8	125.8±2.0
	Seasoning powder	115.2±5.5	14.3±0.8
	Processed seafood	114.7±3.6	59.1±2.2
Method 3 (water-saturated 1-butanol)	Cracker	115.2±4.2	111.9±4.3
	Seasoning powder	107.8±0.9	107.7±0.9
	Processed seafood	114.7±1.7	111.3±2.1

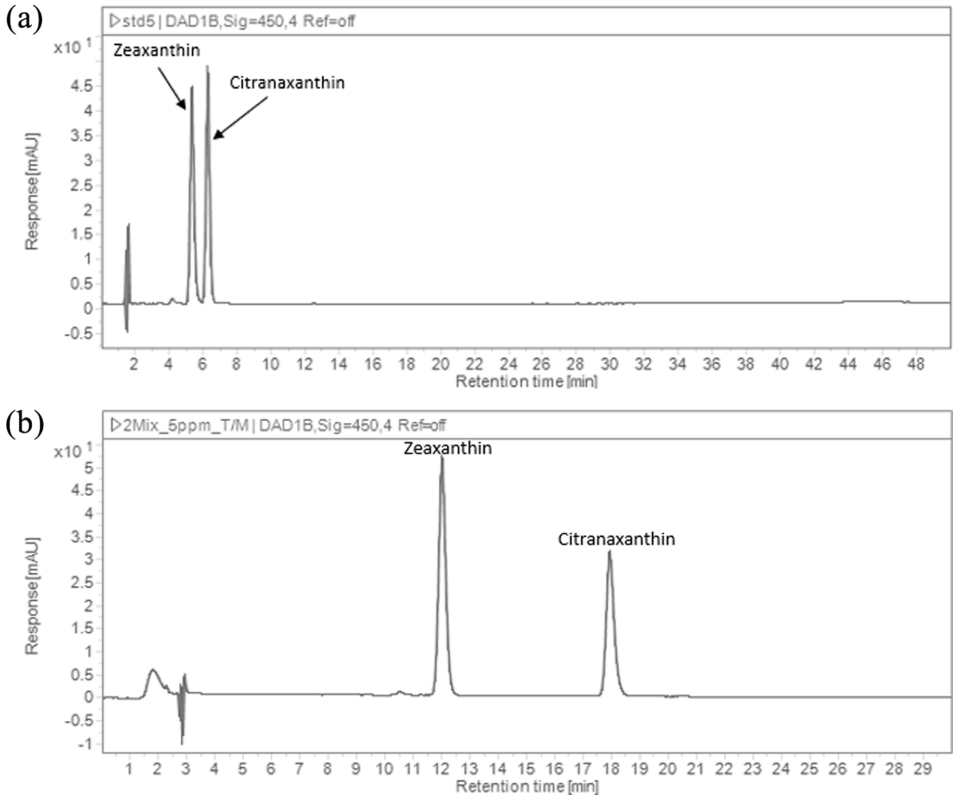


Fig. 2. HPLC-DAD chromatograms of (A) HPLC method 1, (B) HPLC method 2, (C,D) HPLC method 3.

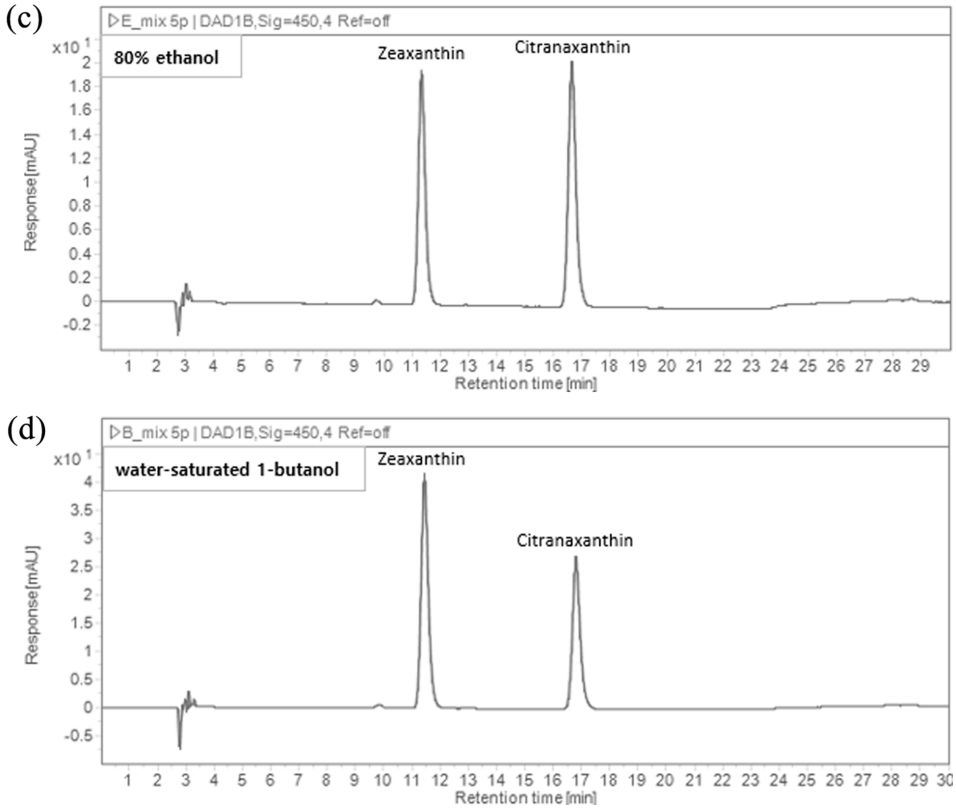


Fig. 2. (Continued) HPLC-DAD chromatograms of (A) HPLC method 1, (B) HPLC method 2, (C,D) HPLC method 3.

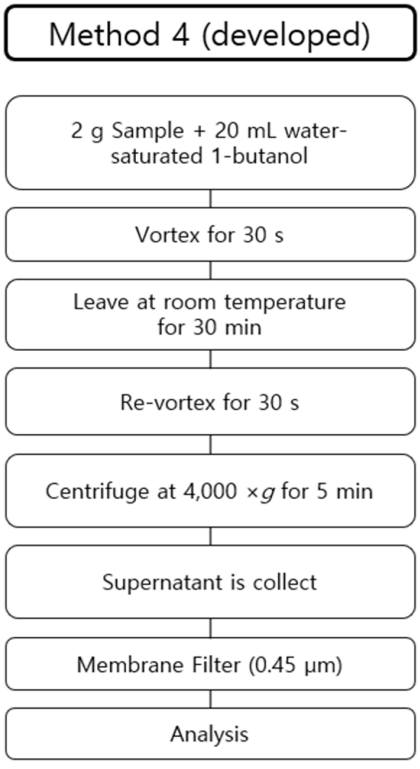


Fig. 3. Developed pretreatment method for extraction of zeaxanthin and citranaxanthin in foods.

전처리 방법의 최적화 및 기기분석조건 확립

Zeaxanthin과 citranaxanthin의 동시분석법 확립을 위해 가장 적합한 것으로 확인된 분석법 3을 기반으로 추출용매, 전처리 방법, filter, column, 이동상 등의 조건을 비교·검토하여 시료(과자, 조미식품, 수산가공식품)에 대한 최적화된 분석법(Method 4)을 개발하였다(Fig. 3).

실험 효율성과 재현성을 고려하여 전처리 과정을 개선하였으며, 카로티노이드계 색소 분리에 일반적으로 사용되는 세 가지 컬럼을 비교 분석한 결과, 분리능이 가장 우수한 컬럼으로 YMC C_{30} (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm)을 선정하였다. 마지막으로 해당 컬럼을 기반으로 이동상 조성과 구배 조건(gradient elution)에 대한 최적화를 수행하였다. 그 결과, YMC Co., Ltd.[17]에서 제시한 용리용액으로 용매 A (MeOH/MTBE/water, 81:15:4, v/v/v)와 용매 B (MeOH/MTBE/water, 7:90:3, v/v/v)를 사용하였고, 이동상의 농도 구배는 0-30 min (100-66.7%, A)으로 하였다(Table 4).

시험법 유효성 검증

확립된 시험법의 직선성을 평가하기 위해, 서로 다른 식품 매트릭스(과자, 조미식품, 수산가공식품)에 표준용액을 각각 1, 2, 5, 10 및 20 mg/kg이 되도록 첨가하여 분석한 결과, 모든 식품 매트릭스에서 결정계수(R^2) 값이 0.99 이

Table 4. HPLC-DAD parameters for the analysis of zeaxanthin and citranaxanthin

Parameters	Conditions		
Instrument	HPLC (Agilent co., Santa clara, CA, USA)		
Detector	DAD		
Column	YMC C30 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm)		
Column oven temp.	35℃		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	1.0 mL/min		
Wavelength	Zeaxanthin (450 nm), citranaxanthin (474 nm)		
Mobile phase	A: Methanol/tert-butyl methyl ether/water (81:15:4, v/v/v) B: Methanol/tert-butyl methyl ether/water (7:90:3, v/v/v)		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	30	66.7	33.3

Table 5. Linearity, LOD and LOQ of zeaxanthin and citranaxanthin in food matrix

Parameter	Zeaxanthin			Citranaxanthin		
	Cracker	Seasoning powder	Processed seafood	Cracker	Seasoning powder	Processed seafood
R^2	0.9999	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
LOD (mg/kg)	0.32	0.11	0.20	0.14	0.20	0.19
LOQ (mg/kg)	0.96	0.33	0.60	0.42	0.60	0.58

Table 6. Accuracy and precision from the intra-and inter-day tests

		Intra-day (n=3)					
		Conc. of zeaxanthin (mg/kg)			Conc. of citranaxanthin (mg/kg)		
Food category		1	5	10	1	5	10
Cracker	Accuracy (%)	109.7±2.3	116.2±2.7	110.8±2.5	99.9±1.9	104.9±1.1	100.5±1.3
	Precision (%RSD)	2.1	2.4	2.2	1.9	1.1	1.3
Seasoning powder	Accuracy (%)	93.1±2.4	110.9±0.1	109.6±1.0	93.6±0.9	101.7±0.5	103.9±1.0
	Precision (%RSD)	2.6	0.1	0.9	1.0	0.5	1.0
Processed seafood	Accuracy (%)	109.5±2.0	118.1±2.7	113.1±0.9	98.7±1.5	106.2±0.2	105.6±0.6
	Precision (%RSD)	1.8	2.3	0.8	1.5	0.2	0.6
		Inter-day (n=3)					
Cracker	Accuracy (%)	105.2±3.8	114.4±3.2	102.3±6.7	99.4±3.7	105.2±0.9	106.9±4.9
	Precision (%RSD)	3.7	2.8	6.5	3.7	0.8	4.6
Seasoning powder	Accuracy (%)	86.6±5.4	105.1±5.8	98.5±8.4	92.0±4.2	99.8±1.5	107.4±2.8
	Precision (%RSD)	6.2	5.5	8.6	4.5	1.5	2.6
Processed seafood	Accuracy (%)	105.0±5.0	114.5±3.4	101.0±9.9	95.6±5.0	104.3±2.0	109.4±3.3
	Precision (%RSD)	4.7	2.9	9.8	5.2	1.9	3.1

상으로 나타나 우수한 직선성을 보였다. Zeaxanthin과 citranaxanthin의 검출한계 및 정량한계는 각각 Mitrowska 등[18]의 보고값(LOD: 0.09, 0.14 mg/L; LOQ: 0.32, 0.48 mg/L)과 유사한 수준으로 확인되었다(Table 5).

정확성과 정밀성 평가는 일내 및 일간 반복 실험을 통해 수행되었으며, 각 식품 시료에 표준용액을 첨가하여 최종 농도가 1, 5, 10 mg/kg이 되도록 조제한 후 matrix-matched 방법으로 분석하였다. 일내 분석의 정확성은 zeaxanthin의 경우 93.1-118.1%, citranaxanthin은 93.6-106.2%로 나타났으며, 일간 분석의 정확성은 각각 86.6-

114.5%, 92.0-109.4%로 나타났다. 정밀성의 경우, 일내 정밀도는 각각 0.1-2.6%, 0.2-1.9%로 나타났고, 일간 정밀도는 2.8-9.8%, 0.8-5.2%로 나타나 우수한 정확성 및 정밀성을 확인하였다(Table 6).

Table 7. The results of the inter-laboratory test

Food category	Parts	Conc. (mg/kg)	Recovery±RSD (%)[a]			Ave (%)	%RSD (%)
			Lab. A[b]	Lab. B[c]	Lab. C[d]		
Cracker	Zeaxanthin	1	105.2±3.7	97.7±6.3	105.0±2.2	102.6	4.2
		5	114.4±2.8	95.4±2.1	108.1±2.1	106.0	9.1
	Citranaxanthin	1	99.4±3.7	91.9±8.9	86.5±5.2	92.6	7.0
		5	105.2±0.8	94.2±4.4	105.0±2.9	101.5	6.2
Seasoning powder	Zeaxanthin	1	86.6±6.2	90.3±4.6	109.8±4.6	95.6	13.0
		5	105.1±5.5	92.1±3.3	106.0±3.9	101.1	7.7
	Citranaxanthin	1	92.0±4.5	87.9±7.0	91.6±7.2	90.5	2.5
		5	99.8±1.5	88.7±7.7	108.2±3.2	98.9	9.9
Processed seafood	Zeaxanthin	1	105.0±4.7	99.7±3.3	96.5±9.7	100.4	4.3
		5	114.5±2.9	93.9±5.5	100.4±5.8	102.9	10.2
	Citranaxanthin	1	95.6±5.1	95.1±9.2	86.0±10.0	92.2	5.9
		5	104.3±1.9	93.2±9.2	99.9±4.73	99.1	5.6

[a] Mean values of 3 times repetitions with relative atandard deviation.
[b] Ministry of Food and Drug Safety.
[c] Fore Front Test Co.,Ltd.
[d] Korea Advanced Food Research Institute.

Table 8. Recovery rate (%) of the zeaxanthin and citranaxanthin in various fooods

Food category[a)]	Number	Recovery rate (%)[b)]	
		Zeaxanthin	Citranaxanthin
SS	7	97.9±0.1-118.8±0.3	103.5±0.5-118.7±0.7
SN	6	99.1±0.3-111.9±0.3	103.5±0.4-117.9±0.8
SE	6	105.7±0.0-116.0±6.9	115.1±7.1-102.0±0.0
GR	3	112.4±1.1-118.6±0.4	110.9±0.5-117.6±0.4
SU	3	108.5±0.1-114.2±3.0	115.1±0.0-119.1±6.6
BE	3	104.4±0.3-109.8±0.1	114.4±0.2-117.1±0.4
NO	3	99.2±0.1-108.5±0.2	104.8±0.8-114.8±0.1
IC	3	106.5±4.3-114.1±0.1	110.3±10.4-118.2±0.1
OL	3	101.6±9.4-114.7±0.4	104.2±9.7-112.5±0.3
ME	3	104.8±0.1-109.3±0..2	113.4±0.1-118.9±0.4
ML	3	101.6±0.1-107.4±0.2	110.4±0.3-113.5±0.1
DR	3	90.6±7.0-119.2±0.0	95.7±7.5-119.7±0.6
PL	3	100.3±9.1-117.2±0.5	106.2±3.0-118.8±0.6
IT	3	105.0±0.4-114.7±0.2	112.4±0.1-119.3±0.1
CC	3	111.1±1.8-117.4±0.4	116.4±3.0-119.1±0.2
Total	55	90.6-119.2	95.7-119.7

[a)] SS (seasoning powder), SN (breads or rice cakes), SE (processed seafood), GR (processed agricultural foods), SU (saccharides), BE (soybean curds of Muk (starch jellies)), NO (noodles), IC (prepared meals), OL (edible fats and oils), ME (processed meat products and packaged meats), ML (milk products), DR (beverages), PL (pickled foods or boiled foods), IT (prepared meals), CC (cocoa products or chocolates).
[b)] Data are shown as the mean±SD (n=3-7).
The percentage of recovery was calculated as follow : recovery (%)=[measured amount-control]/spiked amount (1 mg/kg)×100.

실험실간 검증

본 연구에서 개발한 식품 중 zeaxanthin 및 citranaxanthin 시험법의 신뢰성을 확보하기 위해, 실험실간 시험법 검증을 수행하였다. 시험법 검증은 한국첨단시험연구원 및 한국식품과학연구원과 진행되었으며, 분석 대상 시료는 시험법이 확립된 곳과 동일하게 과자, 조미식품, 수산가공식품으로 설정하였다. 모든 실험은 동일한 전처리 방법 및 HPLC 분석조건 하에 수행되었으며, 회수율 및 상대표준편차를 기준으로 시험법의 정확성과 정밀성을 검증하였다. 그 결과 세 실험실에서의 zeaxanthin과 citranaxanthin의 평균 회수율은 각각 95.6-106.0%, 90.5-101.5%로 나타났으며, RSD는 각각 13.0%, 9.9% 이하로 측정되었다. 이러한 결과는 CODEX[13] 및 MFDS 가이드라인[14]에서 제시하는 기준을 모두 충족하였으며, 본 시험법이 국가 간 적용 가능한 신뢰도 높은 분석법임을 확인하였다(Table 7).

유통 식품의 적용성 검토

확립된 시험법의 적용성을 검토하기 위해, 카로티노이드계 착색료가 사용되는 가공식품을 중심으로 생산 및 수입실적을 파악하였다. 이를 바탕으로 생산 및 수입실적 상위 15개 품목(과자류, 빵류 또는 떡류, 농산가공식품류, 당류, 두부 및 묵류, 면류, 빙과류, 수산가공식품류, 식육가공품 및 포장육, 식용유지류, 유가공품, 음료류, 절임류 또는 조림류, 조미식품, 즉석식품류, 코코아, 초콜릿류)을 검체로 선정하였으며, 각 품목군별로 3-7개의 검체를 수거해 총 55건을 수거하였다. 회수율 측정 결과, 각각 90.6-119.2%, 95.7-119.7%로 MFDS 가이드라인에서 제시한 허용 기준 범위인 70-125%에 적합하였다(Table 8). 특히 모든 품목군에서 평균 회수율이 모두 90% 이상으로 높은 회수율을 확인할 수 있었으며, 표준편차도 낮아 시험법의 재현성과 신뢰성이 우수함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 동시분석법은 식품 중 미지정 착색료의 사용 여부에 대한 신속하고 정확한 검출을 가능하게 하며, 관련 법규나 관리 기준 설정 시 과학적 근거로 활용되어 안전성 확보에 크게 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 연구는 2024년도 한국 식품의약품안전처의 연구개발사업(23191MFDS031)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 국내에서 아직 식품색소로 지정되지 않은 zeaxanthin과 citranaxanthin에 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 적용하여 최적화된 동시 분석법을 개발하고, 이 분석법을 검증하기 위해 수행되었다. 최적의 분석법을 확립하기 위해, 기존에 보고된 다양한 국외 문헌 시험법의 HPLC 분석법을 비교 검토하였다. 그리고 분석 조건 선정 시 선형성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정확성, 반복성, 실험실 간 검증 등의 주요 검증 항목을 고려하여 다양한 식품에 적용 가능한 최적 전처리법을 개발하였다. 개발된 분석법은 우수한 선형성(R^2≥0.999)을 나타내었으며, 식품 매트릭스 내에서 zeaxanthin과 citranaxanthin에 대한 검출한계(LOD)는 각각 0.11-0.32 mg/kg 및 0.14-0.20 mg/kg, 정량한계(LOQ)는 각각 0.33-0.96 mg/kg 및 0.42-0.60 mg/kg으로 확인되었다. 기존 연구에 보고된 전처리 방법은 다양한 식품군에 적용하는 데에 한계를 보였으나, 본 연구에서 개발된 분석법은 카로티노이드 착색료가 사용되는 주요 식품군에서 모두 적용이 가능하였다. 특히 이 방법은 적용성 평가에서 zeaxanthin과 citranaxanthin에 대해 모든 식품군에서 90% 이상의 우수한 동시 회수율을 나타내었다. 또한, 새로운 HPLC 분석법을 적용한 두 물질의 정확도(회수율) 및 정밀도(%RSD)는 식품의약품안전처(MFDS) 가이드라인에서 제시한 기준 범위에 부합하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 동시 분석법은 식품 중 zeaxanthin과 citranaxanthin을 신뢰성 있고 정확하게 분석할 수 있는 방법으로 판단되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Soo Bin Lee https://orcid.org/0000-0001-7309-4771
Da-Ae Lee https://orcid.org/0009-0006-2802-3820
Chae-Wan Baek https://orcid.org/0000-0001-6810-2570
Hye Seon Nam https://orcid.org/0009-0004-9414-3391
Jae Myeong Oh https://orcid.org/0000-0001-6341-4989
Youn Ju Choi https://orcid.org/0009-0007-6688-7678

References

1. Bernal, J., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Advanced analysis of nutraceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 758-774 (2011).
2. González-Peña, M.A., Ortega-Regules, A.E., Anaya de Parrodi, C., Lozada-Ramírez, J.D., Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids-a review. *Plants*, **12**, 313 (2023).
3. Murillo, A.G., Hu, S., Fernandez, M.L., Zeaxanthin: metabolism, properties, and antioxidant protection of eyes, heart, liver, and skin. *Antioxidants*, **8**, 390 (2019).
4. Zhang, S., Liu, Y., Luo, J., Synthesis of analogues of citranaxanthin and their activity in free radical scavenging. *J. Chem. Res.*, **40**, 257-260 (2016).

5. World Health Organization (WHO), (2024, April 4). Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Retrieved from https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database
6. International Agency for Research on Cancer (IARC), (2024, May 10). Agents classifed by the IARC monographs, volumes 1-138. Retrieved from http://monographs.iarc.fc/ENG/Classification
7. Codex Alimentarius Commission (CAC), (2024, March 12). General standard for food additives (codex STAN 192-1995). Retrieved from https://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf
8. Lee, J.S., Kim, Y.H., Kim, J.M., Gang, S.R., Lee, C., Shin, J.W., Chun, H.S., Lee, O.H., Current permitted status and management system of food additives in the inside and outside of the country. *Food Sci. Ind.*, **47**, 46-53 (2014).
9. Strati, I.F., Sinanoglou, V.J., Kora, L., Miniadis-Meimaroglou, S., Oreopoulou, V., Carotenoids from foods of plant, animal and marine origin: an efficient HPLC-DAD separation method. *Foods*, **1**, 52-65 (2012).
10. Schlatterer, J., Breithaupt, D.E., Xanthophylls in commercial egg yolks: quantification and identification by HPLC and LC-(APCI) MS using a C30 phase. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2267-2273 (2006).
11. Shen, R., Yang, S., Zhao, G., Shen, Q., Diao, X., Identification of carotenoids in foxtail millet (*Setaria italica*) and the effects of cooking methods on carotenoid content. *J. Cereal Sci.*, **61**, 86-93 (2015).
12. American Association of Cereal Chemists (AACC) , 2000. AACC approved methods, 10th ed, St Paul, MN, USA.
13. Codex Alimentarius Commission (CAC), 2003. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rome, Italy.
14. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS), 2016. Guidelines on standard procedures for preparing analysis methods, Cheongju, Korea.
15. Jang, G.W., Choi, S.I., Choi, S.H., Han, X., Men, X., Kwon, H.Y., Choi, Y.E., Lee, O.H., Method validation of 12 kinds of food dye in chewing gums and soft drinks, and evaluation of measurement uncertainty for soft drinks. *Food Chem*., **356**, 129705 (2021).
16. Chawla, S., Patel, H.K., Gor, H.N., Vaghela, K.M., Solanki, P.P., Shah, P.G., Evaluation of matrix effects in multiresidue analysis of pesticide residues in vegetables and spices by LC-MS/MS. *J. AOAC Int.*, **100**, 616-623 (2017).
17. YMC Co., Ltd., (2024, April 15). YMC carotenoid. Retrieved from ymc.co.jp/en/columns/ymc_carotenoid/
18. Mitrowska, K., Vincent, U., von Holst, C., Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach. *J. Chromatogr. A*, **1233**, 44-53 (2012).